УДК 591.11:598.2: 577.3-578.088

Макарская Г.В., Тарских С.В., Турицына Е.Г.
(Международный научный центр исследований экстремальных состояний организма при Президиуме ФГБУ науки Красноярский научный центр СО РАН, ФГБУ науки Институт вычислительного моделирования Сибирского отделения Российской академии наук, Институт прикладной биотехнологии и ветеринарной медицины ФГБОУ ВПО «Красноярский государственный аграрный университет»)

АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК КРОВИ КУР ПРИ ВАКЦИНАЦИЯХ

Ключевые слова: иммунизация, фагоцитоз, функциональная активность, активные формы кислорода (АФК), хемилюминесценция, куры.

В условиях промышленного птицеводства профилактика инфекционных болезней кур осуществляется путем многократных иммунизаций, особенно в течение первых 3-месяцев жизни. Состояние иммунного статуса привитого поголовья контролируется по уровню поствакцинальных антител в сыворотке крови. Однако иммунный статус организма кроме специфического иммунитета определяет и неспецифическая резистентность, т.е. врожденный иммунитет, одним из основных механизмов которого выступает фагоцитарная активность клеток крови. В компетенцию этих клеток входит как первичная реакция на вторжение чужеродных агентов, так и участие в кооперативных взаимодействиях специализированных иммунокомпетентных клеток организма в процессе иммунного ответа [1]. Одним из механизмов, обеспечивающих неспецифическую резистентность организма, является способность лейкоцитарных клеток продуцировать активные формы кислорода (АФК) в процессе своего функционирования, наиболее выраженная в состоянии антигенной активации [2, 5, 7, 8].

Цель наших исследований состояла в анализе функциональной активности клеток периферической крови кур на фоне многократных вакцинаций методом хемилюминесцентного мониторинга продукции АФК.

Материалы и методы исследования

Объектом исследований являлась нефракционированная кровь клинически здорового молодняка кур 55-68-суточного возраста яичного кросса «Хайсекс уайт», полученного из ОАО «Птицефабрика Заря» Красноярского края. Птица иммунизирована в рамках реализации плановой программы вакцинаций против инфекционного бронхита кур (ИБК) в возрасте 53 и 64 суток, инфекционного ларинготрахеита (ИЛТ) – в 55 суток и ньюкаслской болезни (НБ) – в 66 суток. Функциональную активность клеток венозной нефракционированной крови кур, взятой из подкожной локтевой вены, оценивали методом Tono-Oke в модификации Земскова с соавторами и Макарской с соавторами [3, 4] при антигенной стимуляции клеток in vitro (индуцированной) и без нее (спонтанной) по кинетике генерации АФК, регистрируемой микрометодом люминол- и люцигенинусиленной хемилюминесценции с использованием аппаратурно-программного комплекса «Хемилюминометр CL-3604» - ПЭВМ [6]. Определение параметров хемилюминесценции проводилось через 48 ч после каждой антигенной стимуляции, т.е. у кур 55-, 58-, 66- и 68-суточного возраста. Всего исследовано 38 образцов крови.

Время записи хемилюминесцентной кривой составляло 90 минут при температуре в регистрационной камере +42оС. Состав реакционной смеси включал 100 мкл гепаринизированной крови, разведенной в 2 раза неокрашенным раствором Хенкса, 200 мкл раствора люминола («Sigma», USA) в концентрации 2,2*10-4М или люцигенина («Sigma-Aldrich», Switzerland) 10-4М на растворе Хенкса при pH=7,4, 50 мкл взвеси частиц монодисперсного латекса размером 2,3 мкм в концентрации 5 108 частиц/мл (ВНИИСК, С.-Петербург), опсонизированных белками пуловой сыворотки крови кур.

О кинетике генерации АФК в системе клеток цельной крови судили по параметрам хемилюминесцентной кривой, принимая во внимание наиболее информативные: амплитуду максимальной активности хемилюминесцентной реакции (Imax, имп./с), время достижения максимума (Tmax, мин.), площадь под кривой хеми-

люминесценции (S, имп. за 90 мин.), определяющей общее количество АФК, генерируемых клетками за время записи хемилюминесцентной кривой, индекс активации (ИА=Sакт./Sспонт., усл. ед.), как отношение интегральных светосумм индуцированной и спонтанной ХЛ.

Регистрируемая кинетика генерации АФК представляет собой интегральную характеристику продукции АФК во вне- и внутриклеточную среду при участии клеточных про- и антиоксидантных ферментативных структур, активирующихся в процессе фагоцитоза, и про- и антиоксидантных факторов, функционирование которых напрямую не связано с фагоцитозом (СОД эритроцитов, металлы с переменной валентностью, витамины и др.).

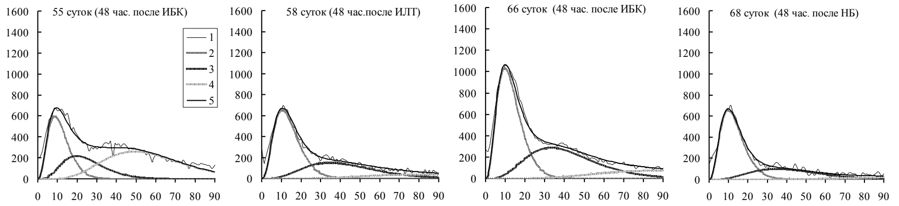
Согласно Magrisso M.Y. et al [9], каждая хемилюминесцентная кинетическая кривая может быть представлена как сумма трех статистических распределений. Первая компонента представляет процессы, связанные с фагоцитозом и происходящие около плазматической мембраны, отражает кинетику внеклеточной генерации АФК. Вторая компонента характеризует процессы внутри клетки, связанные с фагоцитозом и представляет внутриклеточную генерацию АФК. Третья компонента описывает кинетику генерации внутриклеточных АФК, напрямую не связанной с фагоцитозом.

Результаты исследований и обсуждение

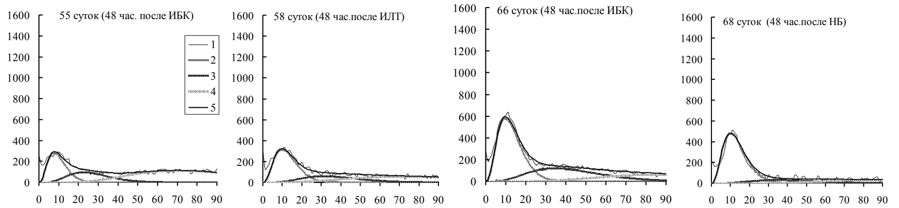
В предыдущих исследованиях [4, 7] установлено, что особенностью продукции АФК клетками крови кур является преимущественная генерации люцигенинзависимых АФК (супероксиданион), в 10-20 раз превышающая продукцию люминолзависимых АФК (перекись водорода, гидроксильный и гипохлоритный радикалы) [4].

Иммунизация молодняка кур живыми вирусвакцинами трех видов с минимальными интервалами между прививками сопровождалась изменением кинетики генерации люминол- и люцигенинзависимых АФК клетками крови в ответ на антигенную стимуляцию in vitro и без нее (рис.1).

Интегральный объем продукции люцигенинзависимых АФК, оцениваемый через 48 часов после очередной иммунизации, уменьшался на 29-47% (таблица 1). Исключение составила ревакцинация против ИБК. Достоверных изменений времени достижения максимума интенсивности ХЛ-реакции после каждой иммуниза-



А)



Б)

Рис.1. Кинетика генерации люцигенинзависимых АФК клетками цельной крови кур при антигенной активации in vitro (А) и без нее (Б) в процессе многократных вакцинаций. По оси абсцисс – продолжительность регистрации в мин., по оси ординат – интенсивность хемилюминесценции (I, имп./с). 1 – зарегистрированная хемилюминесцентная кривая, 2- расчетная первая компонента, 3 – расчетная вторая компонента, 4 – расчетная третья компонента, 5 – интегральная расчетная трех компонент.

ции не отмечалось и варьировало в пределах 10-11 минут. Кинетика продукции люминолзависимых АФК характеризовалась увеличением интегрального объема и максимальной интенсивности после первых трех вакцинаций и резким снижением в 1,5-1,9 раза после иммунизации против НБ (табл.1, строка 4). Смещение максимума респираторного взрыва в ответ на антигенную стимуляцию in vitro на достоверно более поздний срок отмечалось только после вакцинации против ИЛТ (50 мин. против 9 мин.).

Анализ хемилюминесцентной кине-

Таблица 1 – Интегральный объем (S, млн. имп.за 90 мин.) генерации люцигенин- и люминолзависимых АФК клетками крови кур и составляющих его компонент по Magrisso на фоне вакцинаций

Компонента	Возраст, сутки							
	55 (ИБК)	58 (ИЛТ)	66 (ИБК)	68 (НБ)	55 (ИБК)	58 (ИЛТ)	66 (ИБК)	68 (НБ)
	активированная ХЛ				спонтанная ХЛ			
	люцигенинзависимые АФК							
1	0,66	0,87	1,29	0,82	0,27	0,39	0,73	0,62
2	0,49	0,58	1,05	0,38	0,22	0,19	0,46	0,12
3	1,07	0,15	0,25	0,05	0,46	0,25	0,21	0,11
4	2,37	1,68	2,60	1,26	1,03	0,91	1,40	0,85
	люминолзависимые АФК							
1	0,05	0,09	0,03	0,03	0,02	0,06	0,03	0,04
2	0,08	0,06	0,05	0,02	0,03	0,02	0,02	0,01
3	0,03	0,03	0,13	0,05	0,02	0,02	0,03	0,05
4	0,17	0,18	0,21	0,11	0,07	0,11	0,08	0,11

Примечание: 1 – первая компонента, 2 – вторая компонента, 3 – третья компонента, 4 – интегральный зарегистрированный объем.

тики генерации АФК по методу Magrisso M.Y. et al [9] выявил отличия в соотношении объемов ее трех компонентных составляющих (рис.1 и табл.1, компоненты 1, 2 и 3) в процессе вакцинации. Объемы продукции внеклеточных и внутриклеточных люцигенинзависимых АФК в ответ на антигенную стимуляцию in vitro (табл. 1), связанных с фагоцитарной активностью клеток (первая и вторая компоненты), характеризуется приростом после иммунизации против ИБК и ИЛТ и снижением после иммунизации против НБ.

Индекс активации продукции внутриклеточных люцигенинзависимых АФК, связанных с фагоцитозом, удерживается на уровне 2,26 (рис.2, компонента 2), тогда как внеклеточной, на долю которой при-

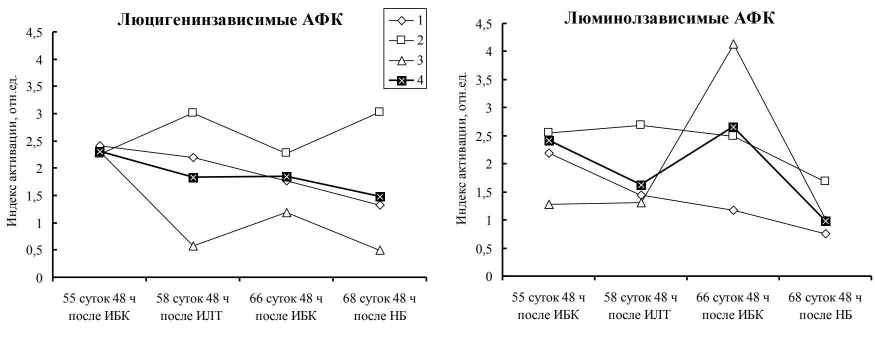


Рис.2. Индекс активации (ИА) генерации люцигенин- и люминолзависимых АФК клетками крови кур при антигенной активации in vitro на фоне вакцинаций, рассчитанного по первой (1), второй (2), третьей компонентам (3) и по интегральному зарегистрированному объему S (4).

ходится большая часть объема АФК, сокращается с 2,42 до 1,33 усл. ед. (рис.2, компонента 1), определяя динамику снижения интегрального индекса активации.

Индекс активации продукции вторичных люминолзависимых АФК в ответ на антигенную стимуляцию in vitro при многократных иммунизациях уменьшался с 2,4 до 1,0 усл. ед., что свидетельствовало о снижение потенциальных функциональных возможностей фагоцитов крови кур.

Используя значения показателей отдельных составляющих, можно провести анализ функционального состояния фагоцитирующих клеток крови молодняка кур при многократных вакцинациях. Согласно классификации Magrisso с соавт. [9] состояние системы генерации АФК характеризуется типами, представленными в таблице 2.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о негативном влиянии иммунизаций молодняка кур живыми вирусвакцинами, особенно против ньюкасл-

Таблица 2 – Анализ функционального состояния клеток неспецифической резистентности крови кур в процессе многократных иммунизаций

Период	Продукция АФК	
	люцигенинзависимых	люминолзависимых
55 суток (48 ч после ИБК)	Интегральный объем продукции АФК значителен. Доля внутриклеточных АФК, связанных с фагоцитозом, чуть выше объема АФК, не связанных с фагоцитозом. Фагоцитозсвязанная внеклеточная продукция АФК на 30% выше внутриклеточной. В этом состоянии *активизированные клетки не преуспевают в фагоцитозе эффективно*.	При среднем интегральном объеме АФК доля непосредственно связанных с фагоцитозом в 4,3 раза выше объема АФК, не связанных с фагоцитозом. Фагоцитозсвязанная внутриклеточная продукция АФК на 60% выше внеклеточной. В этом состоянии *активизированные клетки преуспевают в фагоцитозе эффективно*.
58 суток (48 ч после ИЛТ)	Интегральный объем продукции АФК снижен. Доля АФК, непосредственно связанных с фагоцитозом, в 9,8 раза выше объема АФК, не связанных с фагоцитозом. Фагоцитозсвязанная внеклеточная продукция АФК на 30% выше внутриклеточной. *Активизированные клетки не преуспевают в фагоцитозе эффективно.*	При среднем интегральном объеме доля непосредственно связанных с фагоцитозом в 5 раз выше объема АФК, не связанных с фагоцитозом. Фагоцитозсвязанная внеклеточная продукция АФК на 40% выше внутриклеточной. В этом состоянии *активизированные клетки не преуспевают в фагоцитозе эффективно.*
66 суток (48 ч после ИБК)	Интегральный объем продукции АФК значителен. Доля АФК, непосредственно связанных с фагоцитозом, в 9,2 раза выше объема АФК, не связанных с фагоцитозом. Фагоцитозсвязанная внеклеточная продукция АФК на 20% выше внутриклеточной. В этом состоянии *активизированные клетки не совсем преуспевают в фагоцитозе эффективно.*	При высоком значении интегрального объема АФК доля непосредственно связанных с фагоцитозом ниже на 40% объема АФК, не связанных с фагоцитозом. Фагоцитозсвязанная внутриклеточная продукция АФК на 30% выше внеклеточной, т.е. *клетки мало способны к фагоцитозу, процесс которого идет очень медленно*.
68 суток (48 ч после НБ)	Интегральный объем продукции АФК минимальный. Доля АФК, связанных с фагоцитозом, в 22,3 раза выше объема АФК, не связанных с фагоцитозом. Внеклеточная продукция АФК в 2 раза выше внутриклеточной. *При ранней активации клеток активный фагоцитоз отсутствует.*	При наиболее низком значении интегрального объема АФК доля связанных с фагоцитозом в 1,2 раза ниже объема АФК, не связанных с фагоцитозом. Внеклеточная продукция АФК на 30% выше внутриклеточной. *При ранней активации клеток активный фагоцитоз отсутствует.*

ской болезни, на функциональную активность фагоцитов крови, что проявляется в сокращении потенциальных возможностей клеток отвечать на антигенную стимуляцию генерацией различных форм АФК и может служить пусковым моментом развития поствакцинальных бактериальных осложнений.

Резюме: Исследование влияния многократных антигенных стимуляций живыми вирусвакцинами на способность клеток цельной крови кур генерировать активные формы кислорода (АФК) методом люминол- и люцигенинзависимой хемилюминесценции выявило закономерное изменение кинетики респираторного взрыва и снижение индекса активации продукции первичных (O2-) и вторичных (H2O2, OH-, HClO-) АФК в ответ на антигенную стимуляцию in vitro, что свидетельствует о снижении неспецифической резистентности организма на фоне формирующегося специфического иммунитета.

SUMMARY

The research of influence of the repeating antigenic stimulations of the hens by alive virus-vaccine on ability of whole blood cells of hens to generate active forms of oxygen (ROS) by method of luminol- and lucigenin depending chemiluminescence has revealed natural change of the kinetics of the respiratory explosion and decrease in an index of activation of production primary (O2-) and secondary (H2O2, OH-, HClO-) ROS in reply to antigenic stimulation in vitro with increase in number of immunizations. That testifies about decreasing in nonspecific resistance of an organism on a background of just forming specific immunity.

Keywords: immunization, phagocytosis, functional activity, reactive oxygen species (ROS), chemiluminescence, hens.

Литература

1. Бахов Н.И., Майчук Ю.Ф., Корнев А.В. Механизмы защиты организма от вирусных инфекций: нейтрофильные лейкоциты // Успехи современной биологии. 2000. Т.130. № 1. С.23-35.
2. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи биологической химии. 2009. Т. 48. С. 341-388.
3. Земсков В.М., Барсуков А.А. Методические рекомендации: изучение функционального состояния фагоцитов человека (кислородный метаболизм и подвижность клеток). М.: Институт иммунологии МЗ СССР, 1988. 20 с.
4. Макарская Г.В., Тарских С.В., Турицына Е.Г. Люминол- и люцигенинзависимая хемилюминесценция клеток цельной крови кур в постнатальном онтогенезе // Доклады РАСХН. 2011. № 3. С.46-48.
5. Маянский Д. Н. Лекции по клинической патологии: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 464 с.
6. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006. 556 с.
7. Турицына Е.Г., Макарская Г.В., Тарских С.В. Особенности кислородного метаболизма клеток крови кур при иммунизации // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2011. № 2 (218). С.84-89.
8. Conlon P, Smith D, Gowlett T. Oxygen radical production by avian leukocytes // Can. J. Vet. Res. 1991. V. 55. № 2. P. 193-195.
9. Magrisso M.Y., Alexandrova M.L., Markova V.I. et al. Functional states of polymorphonuclear leukocytes determined by chemiluminescent kinetic analysis // Luminescence. 2000. V. 15. P. 143-145.

Контактная информации об авторах для переписки

Макарская Галина Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт вычислительного моделирования СО РАН (ИВМ СО РАН), e-mail: mgv@icm.krasn.ru

Тарских Светлана Вениаминовна, ведущий инженер Международного научного центра исследований экстремальных состояний организма при Президиуме Федерального государственного бюджетного учреждения науки Красноярский научный центр СО РАН, e-mail: tsv@santa.krs.ru

Турицына Евгения Геннадьевна, доктор ветеринарных наук, доцент института прикладной биотехнологии и ветеринарной медицины Федерального государственного бюд¬жетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Красноярский государственный аграрный университет», e-mail: turitcyna@mail.ru

Просьба вести переписку с Турицыной Евгенией Геннадьевной